

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

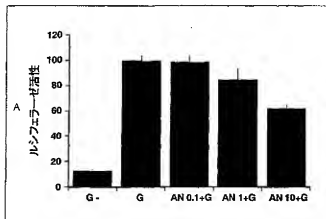
(10) 国際公開番号
WO 2004/018670 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 14/47, 16/18, 7/08, A61K 38/00, A61P 5/24, G01N 33/53
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010596
- (22) 国際出願日: 2003年8月21日 (21.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-243750 2002年8月23日 (23.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 汾陽 光盛 (KAWAMINAMI, Mitsumori) [JP/JP]; 〒034-0089 青森県十和田市西二十三番町35-1 B-201 Aomori (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都港区赤坂二丁目8番5号若林ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:
一 国際調査報告書

(続葉有)

(54) Title: INHIBITOR OF PHYSIOLOGICAL ACTIVITY OF ANNEXIN 5

(54) 発明の名称: アネキシン5の生理活性抑制物質



A...LUCIFERASE ACTIVITY

(57) Abstract: It is intended to provide a polypeptide inhibiting the physiological activity of annexin 5; its derivative; a DNA encoding the polypeptide; an antibody binding specifically to the polypeptide; and a method of using the same. Namely, an inhibitor of the physiological activity of annexin 5 which comprises a peptide sequence consisting of 15 amino acid residues in the amino terminal side of annexin 5 or a polypeptide derivative or a modified polypeptide containing this sequence. This inhibitor antagonistically inhibits the function of annexin 5 and thus inhibits the physiological activity of annexin 5. The inhibitor of the physiological activity of annexin 5 inhibits the physiological activity of annexin 5 and thus inhibits the synthesis and release of L.H. by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in which annexin 5 participates. Moreover, a DNA encoding the peptide sequence which is a sequence specific to annexin 5; its antisense oligonucleotide; its antibody; and a method of using the same.

(57) 要約: アネキシン5の生理活性を抑制するポリペプチド、及びその誘導体、更には、該ポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体及びそれらの利用方法を提供

(続葉有)

WO 2004/018670 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

ものである。アネキシンのアミノ末端側、15アミノ酸残基からなるペプチド配列及び該配列を含有するポリペプチド誘導体又は修飾ポリペプチドからなるアネキシンの生理活性抑制物質。該物質は、アネキシンの作用を拮抗的に阻害し、アネキシンの生理活性を抑制する。本発明のアネキシンの生理活性抑制物質は、アネキシンの生理活性を抑制して、アネキシンの関与する性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）によるLHの合成・放出を抑制する。本発明は、更にアネキシンの特異配列である本発明のペプチド配列をコードするDNA、そのアンチセンスオリゴヌクレオチド、及び抗体とその利用方法からなる。

明 細 書

アネキシン５の生理活性抑制物質

5 技術分野

本発明は、アネキシン５の生理活性抑制物質及び該生理活性抑制物質を有効成分とするアネキシン５の生理活性抑制剤、特にアネキシン５の生理活性を抑制するポリペプチド、該ポリペプチドのポリペプチド誘導体又は修飾ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体及びそれらの利用に関する。

背景技術

動物個体において、細胞間の情報連絡とそれに基づく細胞の機能変化は、動物個体の恒常性を維持するための基本的プロセスであり、そのために、無機イオンからタンパク質までのさまざまな物質が情報担体として関与している。中でも、カルシウムイオンは、多くの細胞で情報伝達に利用される重要な情報担体である。カルシウムイオンは、各種タンパク質に結合することによって、そのタンパク質機能の賦活化や分布の変化をもたらす、細胞固有の生理機能の発現に寄与している。

近年、新しいカルシウム結合タンパク質として、アネキシファミリーのタンパク質が注目を集めている (Cell 55, 1-3, 1988, Biochim. Biophys. Acta 1197, 63-93, 1994)。アネキシンは、分子内に約 70 アミノ酸残基からなる相同性の高い 4 回 (アネキシン 6 は 8 回) の繰り返し構造を持ち、この部位がカルシウムとリン脂質への結合能を示す (Cell 55, 1-3, 1988, Biochemistry 26, 8067-8092, 1987)。カルモジュリンやトロポニンなどの、いわゆる EF パンドスーパーファミリーに属する

タンパク質とは、カルシウム結合様式の異なる新しいカテゴリーのタンパク質である。アネキシンは、カルシウム濃度に依存したリン脂質結合能という機能を持つこと、動物種間で相同性が極めて高いことから、重要な生理機能を担ったタンパク質であると推定されている。

- 5 アネキシンをを用いた生化学的実験では、(1)プロスタグランジン産生の律速酵素である、ホスホリパーゼA₂の抑制作用(Nature 320, 77-81, 1986, J. Biol. Chem. 263, 10, 799-811, 1988)、(2)血液凝固抑制作用(Biochemistry 26, 8087-8092, 1987, Biochemistry 27, 6645-6653, 1988, J. Biol. Chem. 265, 17, 420-423, 1990)、(3)電位依存性のカルシウムチャネル活性、(4)プロテインキナーゼCの抑制作用(Eur. J. Biochem. 191, 421-429, 1990, Biochemistry 31, 1886-1891, 1992)、(5)膜の融合活性などの細胞内外を作用点とする機能(Cell 55, 1-3, 1988, J. Biol. Chem. 265, 13-25, 1990, J. Cell. Biol. 114, 1135-1147, 1991)が示唆されているものの、作用点を含め実際の生理機能は不明のままであった。

- 15 アネキシン5は、各種組織にもっとも豊富に存在するアネキシンのひとつである。上記の機能に加え、アネキシン5はタンパク質キナーゼC活性及び血液凝固を阻害する(J. Biol. Chem. 265, 17420-17423, 1990, Biochemistry 31, 1886-1891, 1992)。コラーゲンに対する高い親和性が報告されており、基底膜への細胞付着における役割が示唆されている(FEBS Lett 310, 143-147, 1992)。アネキシン5は、広く組織間に分布しており、その分布は、細胞種に特異的である(J. Histochem. 39, 1189-1198, 1991, Endocrine 5, 9-14, 1996)。また、アネキシン5は卵巣腫瘍のマーカータンパク質として利用可能であり(Gynecol Obstet Invest 32, 107-111, 1991)、アネキシン5の自己抗体は何人かの紅斑性狼瘡(LE: lupus erythematosus)患者で検出されている(Am. J. Hematol.

47, 56-58, 1994)。こうした観察結果は、アネキシン5が、いくつかの重要な細胞機能に関与していることを示唆している。

本発明者は、アネキシン5が下垂体前葉で発現することを報告した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 186, 894-898, 1992)。以前、本発

- 5 明者の研究室にて行った、抗アネキシン5又は抗LH β (LH=黄体形成ホルモン)のいずれかで染色した下垂体組織隣接切片の免疫組織化学的研究では、性腺刺激ホルモン産生細胞上でアネキシン5が集約的に発現していた (Cell Tissue Res. 292, 85-89, 1998)。しかし、性腺刺激ホルモン産生細胞それ自体がアネキシン5を合成しているのかはわから
- 10 なかった。というのは、たとえ性腺刺激ホルモン産生細胞と比較すれば弱いものであるにしろ、下垂体細胞の大半がアネキシン5に対する免疫応答性をもつことが判明しているからである (Cell Tissue Res. 292, 85-89, 1998, Endocr. J. 2, 357-362, 1994)。

- 下垂体前葉におけるアネキシン5のmRNAの発現は、卵巣切除後に
- 15 増大し、この増大はエストロゲンの投与によって抑制された (Mol. Cell Endocrinol. 141, 73-78, 1998)。これらの知見から、本発明者は、性腺刺激ホルモン分泌にアネキシン5が果たす役割を提案し、下垂体性腺刺激ホルモン産生細胞におけるアネキシン5の役割について調査した結果、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH)の刺激作用のもとで性腺刺
- 20 激ホルモン産生細胞によってアネキシン5のmRNAが発現することを実証し、アネキシン5がインビトロでのLH及び卵胞刺激ホルモン (FSH)の放出を刺激することを報告した (Neuroendocrinology 75, 2-11, 2002)。アネキシン5の遺伝子及びアミノ酸配列については、既に報告があり (J. Bio. Chem. 263, 22, 10799-10811, 1988, Gene 149, 2, 253-260,
- 25 1994)、それらの配列については、GenBankのデータベースにおいて、アクセッションナンバー、M21731によって、NCBIのデータ

ベースにおいて、アクセッションナンバー、NM001154によって検索することができる。

本発明者は、アネキシン5の生理的機能及び構造について研究の結果、アネキシン5のアミノ末端側、15アミノ酸残基からなるアネキシン5作用ペプチド配列があることを見出し、本発明を完成するに至った。この配列は、アネキシン5に特異的な配列であり、この配列を含有するポリペプチド誘導体又は修飾ポリペプチドを構築することにより、アネキシン5の作用を拮抗的に阻害し、アネキシン5の生理活性を抑制することができる。

- 10 例えば、前記するように、アネキシン5については、その生理機能研究が進展し、近年本発明者らによって、このタンパク質が下垂体前葉、性腺刺激ホルモン（黄体形成ホルモンと卵胞刺激ホルモン）の分泌を著しく刺激することが見い出され、性腺刺激ホルモン産生細胞における当該ホルモンの合成・放出を調節することが確認されている。この下垂体
- 15 性腺刺激ホルモン産生細胞におけるアネキシン5の作用に拮抗して、本発明の生理活性抑制物質を投与することにより、アネキシン5の作用を阻害して、その結果として性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）の作用を抑制することができる。

- また、本発明においては、本発明のアネキシン5における作用特異配列を利用して、該ポリペプチド配列に特異的に結合する抗体を作製することにより、該抗体を用いて、アネキシン5の検出、測定を行うことができる。また、該アネキシン5における作用特異配列をコードするDNA配列を用いて、該配列のアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製することにより、アネキシン5の遺伝子の発現を抑制したり、またアネキシン5の遺伝子の検出用プローブとして用いることができる。
- 25

発明の開示

- すなわち本発明は、配列表の配列番号 1 のポリペプチド又は配列表の配列番号 1 のポリペプチド配列を含むアネキシン 5 の生理活性抑制物質（請求項 1）や、配列表の配列番号 1 のポリペプチドの 1 ～数個のアミノ酸を欠失、置換又は付加したポリペプチド配列を含み、かつアネキシン 5 の生理活性抑制作用を有するアネキシン 5 の生理活性抑制物質（請求項 2）や、配列表の配列番号 1 のポリペプチド配列を含む物質が、配列表の配列番号 1 のポリペプチド配列を含むポリペプチド誘導体であることを特徴とする請求項 1 記載のアネキシン 5 の生理活性抑制物質（請求項 3）や、配列表の配列番号 1 のポリペプチド配列を含む物質が、配列表の配列番号 1 のポリペプチド配列を含む修飾ポリペプチドであることを特徴とする請求項 1 記載のアネキシン 5 の生理活性抑制物質（請求項 4）や、配列表の配列番号 1 のポリペプチド配列を含む物質が、配列表の配列番号 1 のポリペプチドのアミノ末端をアセチル基で修飾したポリペプチドであることを特徴とする請求項 4 記載のアネキシン 5 の生理活性抑制物質（請求項 5）や、アネキシン 5 の生理活性抑制が、アネキシン 5 の性腺刺激ホルモン放出ホルモンの合成・放出を調節する生理活性の抑制であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか記載のアネキシン 5 の生理活性抑制物質（請求項 6）からなる。
- また本発明は、配列表の配列番号 1 のポリペプチドをコードすること
- を特徴とする DNA 配列（請求項 7）や、配列表の配列番号 1 のポリペプチドをコードする DNA 配列が、配列表の配列番号 2 の DNA 配列であることを特徴とする請求項 7 記載の DNA 配列（請求項 8）や、請求項 7 又は 8 記載の DNA 配列とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつアネキシン 5 の遺伝子の発現及びアネキシン 5 の生理活性機能を特異的に抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド（請求項 9）

や、請求項 7 又は 8 記載の DNA 配列のアンチセンス鎖の全部又は一部からなるアネキシン 5 の遺伝子検出用プローブ（請求項 10）や、配列表の配列番号 1 のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体（請求項 11）や、抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 11 記載の抗体（請求項 12）や、抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項 11 記載の抗体（請求項 13）からなる。

- さらに本発明は、請求項 1 または 2 記載のアネキシン 5 生理活性抑制物質を有効成分とすることを特徴とするアネキシン 5 の生理活性抑制剤（請求項 14）や、請求項 3 記載のアネキシン 5 の生理活性抑制物質を有効成分とすることを特徴とするアネキシン 5 の生理活性抑制剤（請求項 15）や、請求項 4 又は 5 記載のアネキシン 5 の生理活性抑制物質を有効成分とすることを特徴とするアネキシン 5 の生理活性抑制剤（請求項 16）や、アネキシン 5 の生理活性抑制が、アネキシン 5 の性腺刺激ホルモンの合成・放出を調節する生理活性の抑制であることを特徴とする請求項 14～16 のいずれか記載のアネキシン 5 の生理活性抑制剤（請求項 17）や、請求項 11～13 のいずれか記載の抗体を用いることを特徴とするアネキシン 5 の検出、測定方法（請求項 18）からなる。

20 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明の実施例において調製された、本発明のアネキシン 5 の生理活性抑制物質 AN-14 の MASS スペクトル分析の結果を示す図である。

- 第 2 図は、本発明の実施例において調製された、本発明のアネキシン 5 の生理活性抑制物質 AN-14 の HPLC の結果を示す図である。
（紫外線波長：210nm、溶出：A 溶液：0.1% TFA/H₂O、

B 溶液：0.1% TFA/ACN、グラジエント：10%～60%のB 溶液で30分間、流速：1.0 ml/分)

第3図は、ラット下垂体初代培養細胞におけるGnRHのLH放出量 に対するAN-14の影響を、時間分解蛍光免疫測定法により測定した

5 結果を示す図である。

第4図は、下垂体ゴナドトロフ株化細胞であるLβT2細胞の増殖に 対するGnRHの抑制効果に対するAN-14の拮抗作用を示す図であ

る。
第5図は、LHβプロモーター領域(-797～+5)をルシフェラーゼ遺 伝子発現ベクターであるpGL3に導入して作製した、LHβプロモーターレポ

10 ーターベクターを示す図である。

第6図は、GnRHのLHβサブユニット遺伝子発現に対する促進効 果へのAN-14の拮抗作用をルシフェラーゼ活性を測定することによ

り解析した結果を示す図である。

15

発明を実施するための最良の形態

本発明は、配列表の配列番号1のポリペプチド又は配列表の配列番号 1のポリペプチド配列を含むアネキシン5の生理活性抑制物質からなる。 該配列番号1のポリペプチド配列は、アネキシン5のアミノ末端側、1

20 5アミノ酸残基に相当する。該配列は、アネキシン5の作用ペプチド配 列としての機能を有する特異的な配列であり、この配列を含有し、かつ アネキシン5の続きの配列とは相違するポリペプチド誘導体又は修飾ポ リペプチドを構築することにより、アネキシン5の作用を拮抗的に阻害 し、アネキシン5の生理活性を抑制することができる

25 本発明のポリペプチド誘導体としては、機能、合成或いは取り扱いの 容易性から、配列番号1の15アミノ酸残基に続いて、数個から数十の

適宜のアミノ酸を結合したポリペプチド誘導体を用いることが好ましい。アセチル基等で修飾したポリペプチドとしては、アミノ末端をアセチル基で修飾したポリペプチドが、特に好ましい。

また、本発明は、配列表の配列番号 1 のポリペプチドの 1 ～数個のアミノ酸を欠失、置換又は付加したポリペプチド配列を含み、かつアネキシン 5 の生理活性抑制作用を有する、配列表の配列番号 1 のポリペプチドの変異体のアネキシン 5 生理活性抑制物質からなる。

本発明のアネキシン 5 の生理活性抑制物質はアネキシン 5 の生理活性抑制剤として使用することができる。本発明のアネキシン 5 の生理活性抑制物質は、アネキシン 5 の生理機能を、拮抗阻害的に阻害し、アネキシン 5 の生理活性を抑制する。例えば、アネキシン 5 は、視床下部の分泌する性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の下垂体ゴナドトロフでの作用を媒介することが知られているが、本発明の生理活性抑制物質の投与により、アネキシン 5 の生理機能を拮抗的に阻害し、性腺刺激ホルモン (LH 及び FSH) の合成・放出を抑制することができる。

本発明のアネキシン 5 の生理活性抑制物質を、細胞に投与するには、該生理活性抑制物質を注射剤のような形で投与することができる。この場合には、該生理活性抑制物質を水や生理食塩水又はブドウ糖溶液等に溶解させて調製し、必要に応じて薬学的に許容される緩衝剤、保存剤或いは安定化剤を含有させて投与することができる。本発明のアネキシン 5 の生理活性抑制物質を、アネキシン 5 が発現されている卵巣、副腎、心臓、肺、甲状腺などの器官に投与して、アネキシン 5 が関与している生理機能を抑制することができる。

本発明のアネキシン 5 の生理活性抑制物質におけるポリペプチドは、周知のポリペプチドの合成法によって合成することができる。また、該ポリペプチドをコードする DNA 配列を用いて遺伝子工学操作によって、

製造することもできる。

本発明のアネキシン5の生理活性抑制物質である配列表の配列番号1のポリペプチドをコードするDNA配列は、配列表の配列番号2の配列で示される。該配列は、アネキシン5の特異配列を示す。該DNA配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを構築し、用いることにより、アネキシン5の遺伝子の発

現及びアネキシン5の生理活性機能の特異的に抑制することができる。

なお、ここで本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドが「DNA配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズする」条件としては、

例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、該温度条件以外に種々の要素があるが、当業者であれば種々の要素を組み合わせ、前記ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することができる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に導入するには、この分野で通常用いられる方法を用いることができる。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞へ直接投与することができる。また、必要に応じて、薬学的に許容される細胞内導入試薬、例えば、リポフェクチン試薬、リポフェクトアミン試薬、DOTAP試薬等と共に投与することができる。また、該DNA配列のアンチセンス鎖の全部又は一部からなる配列を作製して、アネキシン5の遺伝子検出用プローブとして用いることもできる。

更に、本発明においては、本発明のポリペプチドである配列表の配列

番号1のポリペプチドを抗原として用いて、抗体を誘導し、該ポリペプチドに特異的に結合する抗体を産生することができる。該抗体は、モノクローナル抗体として、又は、ポリクローナル抗体として、本発明のポリペプチドを抗原として、常法により作製することができる。該抗体と

5 アネキシン5の抗原抗体反応を用いて、周知の免疫検査法により、アネキシン5の検出、測定を行うことができる。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

10 (アネキシン5生理活性抑制物質AN-14の調製)

ヒトアネキシン5のcDNA配列(データベース: GenBank アクセションナンバー: M21731 (J. Biol. Chem. 263, 22, 10799-10811, 1988))をもとに、アミノ末端側15アミノ酸残基からなるペプチドの設計・合成を行い、AN-14とした。AN-14は、ヒトアネキシン5

15 のアミノ末端側15アミノ酸残基(配列表配列番号1)を有し、該ペプチドのアミノ末端側(アラニン)をアセチル化したものである。すなわち、Ac-AQVLRGTVTDFPGFDなるペプチド構造を有する。AN-14のMASSデータ、及びHPLCデータを、第1図及び第2図に示す。

20 (AN-14の下垂体初代培養細胞におけるGnRHのLH放出促進作用の抑制)

成熟したメスのウイスター・イマミチ系ラットの下垂体より細胞を分離し(Endocrinology 107, 1095-1104, 1980)、1ウエルあたり 10^5 個の細胞を96ウエルの培養トレーを用いて10%牛胎児血清を含むDM

25 EM培地中で2日間前培養した。実験当日に牛胎児血清を除いた培養液で3時間前培養し、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH: コンセ

ラール)を加えて1時間培養した。実験群には、GnRHに加えてAN-14を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えた。各群とも、 $n=5$ で行った。1時間後に培養液を回収して時間分解蛍光免疫測定法でラットの黄体形成ホルモン(luteinizing hormone: LH)の放出量を測定した(第3図)。

- 5 その結果、GnRHのみの群(●-●)と比べ、GnRHにAN-14を添加した群(■-■)ではGnRH濃度依存的にLHの放出が抑制されることが明らかになった。

(下垂体ゴナドトロフ株化細胞である $L\beta T2$ 細胞の増殖に対するGnRHの抑制効果に対するAN-14の拮抗作用)

- 10 下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞(ゴナドトロフ)を腫瘍化して樹立した株化細胞である $L\beta T2$ 細胞(カリフォルニア大学サンディエゴ校のP. Mellon博士より供与)を継代し、コンフルエントの状態に達する前に分離し、直径35mmのディッシュに20万個の細胞を播種して10%の牛胎児血清を含むDMEM培地中で培養した。その際、 $L\beta T2$ 細胞をGnRH未添加群(対照群)、DMEM培地に 10^{-7}M のGnRH(コンセラル)のみを添加した群、GnRHと $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のAN-14を添加した群、GnRHと細胞増殖に関わるシグナル伝達因子であるMAPKK(MEK)の抑制剤であるPD98059を添加した群の計4群に分けてそれぞれ培養を行い、4日目に細胞をトリプシンで剥離して顕微鏡観測下で細胞数を数えた(第4図)。その結果、GnRHは細胞増殖を抑制し、AN-14はその作用に拮抗することが明らかになった。

(GnRHのLH β サブユニット遺伝子発現に対する促進効果へのAN-14の拮抗作用の観察)

- 25 LH β プロモーター領域(-797~+5)をルシフェラーゼ遺伝子発現ベクターであるpGL3(Promega社製)に導入し、ホタル・ルシ

エラーゼ遺伝子をレポーターとするLH β プロモーターレポーターベクター（-797/+5 LH β LUC：第5図）を作製した。このレポーターベクターをリポフェクション法によりL β T2細胞に導入後、42時間の培養を行った。次に、LH β プロモーターレポーターベクター導入L

5 β T2細胞をそれぞれ、G-群（プロモーターを入れない空のベクターを導入した対照群）、G群（ 10^{-7} MのGnRH（コンセラル）を添加）、AN0.1+G群（GnRHと0.1 μ g/mlのAN-14を添加）、AN1+G群（GnRHと1 μ g/mlのAN-14を添加）、AN10+G群（GnRHと10 μ g/mlのAN-14を添加）の計5

10 群（各群とも、n=5）にわけ、6時間の培養を行った後、常法により細胞を溶解してルシフェラーゼ活性を測定した（第6図）。その結果、GnRHは著しくLH β サブユニット遺伝子発現を促進し、AN-14は濃度依存的にGnRHの作用に対して拮抗することが明らかになった。

15 産業上の利用可能性

本発明により、アネキシン5の生理活性抑制物質及び該生理活性抑制物質を有効成分とするアネキシン5の生理活性抑制剤を提供することによって、アネキシン5の生理活性を調整することができる。例えば、本発明のアネキシン5の生理活性抑制物質を、アネキシン5が発現している卵巣、副腎、心臓、肺、甲状腺などの器官に投与して、アネキシン5

20 が関与している生理機能を抑制することができる。これによって、例えば、性ホルモンの分泌を抑制して、性ホルモン依存性疾患に対する予防或いは治療を可能とする。

また、本発明によって、アネキシン5の特異配列であるポリペプチド

25 をコードするDNA、そのアンチセンスオリゴヌクレオチド、更には本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供することによって、

アネキシン 5 の遺伝子の発現の調整を行ったり、或いはアネキシン 5 の検出、測定を可能とする。これらはアネキシン 5 の生理機能の解明に役立ち、かつアネキシン 5 の生理活性調節にも役立つものであり、アネキシン 5 に関する機能障害の予防や治療に役立つものである。

請 求 の 範 囲

1. 配列表の配列番号1のポリペプチド又は配列表の配列番号1のポリペプチド配列を含むアネキシン5の生理活性抑制物質。
- 5 2. 配列表の配列番号1のポリペプチドの1～数個のアミノ酸を欠失、置換又は付加したポリペプチド配列を含み、かつアネキシン5の生理活性抑制作用を有するアネキシン5の生理活性抑制物質。
3. 配列表の配列番号1のポリペプチド配列を含む物質が、配列表の配列番号1のポリペプチド配列を含むポリペプチド誘導体であることを特徴とする請求項1記載のアネキシン5の生理活性抑制物質。
- 10 4. 配列表の配列番号1のポリペプチド配列を含む物質が、配列表の配列番号1のポリペプチド配列を含む修飾ポリペプチドであることを特徴とする請求項1記載のアネキシン5の生理活性抑制物質。
5. 配列表の配列番号1のポリペプチド配列を含む物質が、配列表の配列番号1のポリペプチドのアミノ末端をアセチル基で修飾したポリペプチドであることを特徴とする請求項4記載のアネキシン5の生理活性抑制物質。
- 15 6. アネキシン5の生理活性抑制が、アネキシン5の性腺刺激ホルモン放出ホルモンの合成・放出を調節する生理活性の抑制であることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載のアネキシン5の生理活性抑制物質。
- 20 7. 配列表の配列番号1のポリペプチドをコードすることを特徴とするDNA配列。
8. 配列表の配列番号1のポリペプチドをコードするDNA配列が、配列表の配列番号2のDNA配列であることを特徴とする請求項7記載のDNA配列。
- 25 9. 請求項7又は8記載のDNA配列とストリンジェントな条件下でハ

イブリダイズし、かつアネキシン 5 の遺伝子の発現及びアネキシン 5 の生理活性機能の特異的に抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド。

10. 請求項 7 又は 8 記載の DNA 配列のアンチセンス鎖の全部又は一部からなるアネキシン 5 の遺伝子検出用プローブ。

5 11. 配列表の配列番号 1 のポリペプチドを用いて誘導され、該ポリペプチドに特異的に結合することを特徴とする抗体。

12. 抗体が、モノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 11 記載の抗体。

13. 抗体が、ポリクローナル抗体であることを特徴とする請求項 11

10 記載の抗体。

14. 請求項 1 または 2 記載のアネキシン 5 生理活性抑制物質を有効成分とすることを特徴とするアネキシン 5 の生理活性抑制剤。

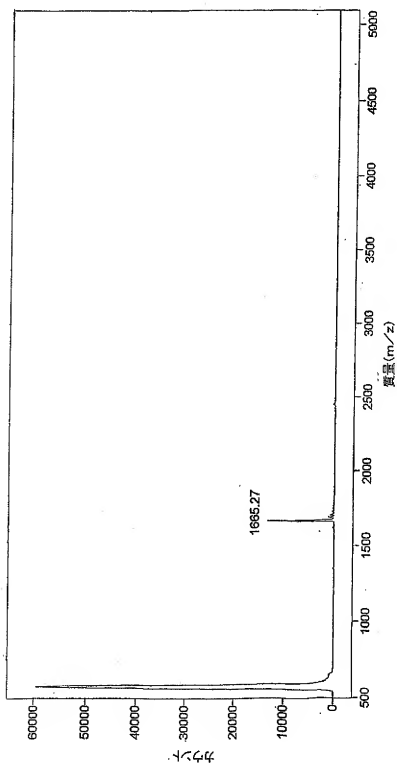
15. 請求項 3 記載のアネキシン 5 の生理活性抑制物質を有効成分とすることを特徴とするアネキシン 5 の生理活性抑制剤。

15 16. 請求項 4 又は 5 記載のアネキシン 5 の生理活性抑制物質を有効成分とすることを特徴とするアネキシン 5 の生理活性抑制剤。

17. アネキシン 5 の生理活性抑制が、アネキシン 5 の性腺刺激ホルモンの合成・放出を調節する生理活性の抑制であることを特徴とする請求項 14～16 のいずれか記載のアネキシン 5 の生理活性抑制剤。

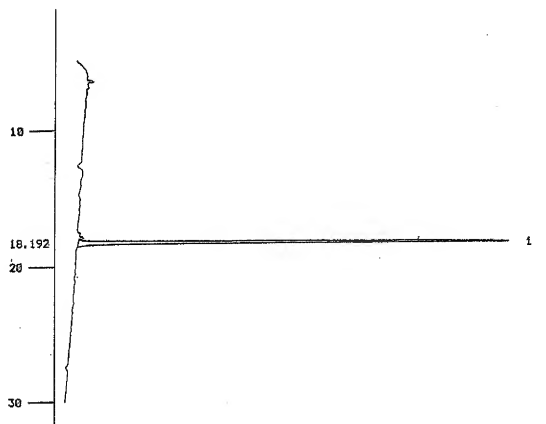
20 18. 請求項 11～13 のいずれか記載の抗体を用いることを特徴とするアネキシン 5 の検出、測定方法。

第 1 図

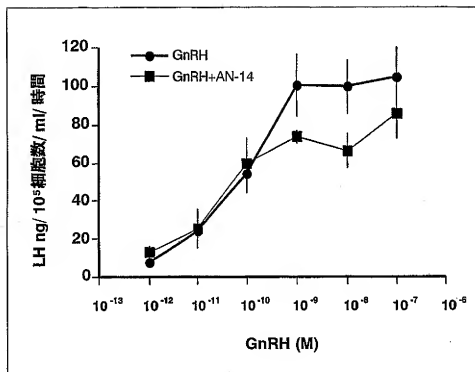


.444

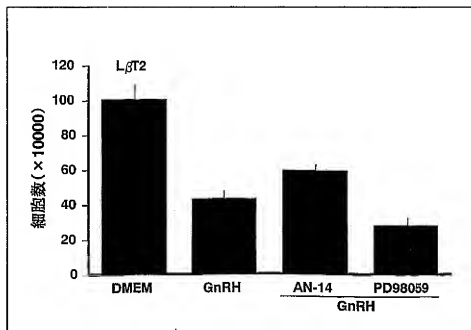
第 2 図



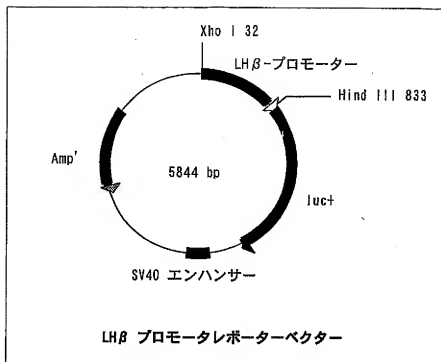
第 3 図



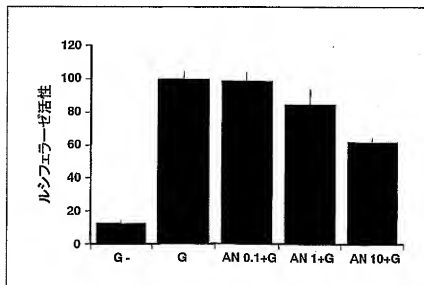
第 4 図



第 5 図



第 6 図



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Bioactive substances of Annexin 5 (AN-14)

<130> YG2003-24PCT

<150> JP2002-243750

<151> 2002-08-23

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe Asp

1

5

10

15

<210> 2

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Base Sequence 145-190 of Annexin 5

<400> 2

gca cag gtt ctc aga ggc act gtg act gac ttc cct gga ttt gat

45

Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe Asp

1

5

10

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10596

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C07K14/47, C07K16/18, C07K7/08, A61K38/00,
A61P5/24, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C07K14/47, C07K16/18, C07K7/08, A61K38/00,
A61P5/24, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq,
Genbank/EMBL/DBJ/Geneseg

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Volker Gerke et al., Annexins and membrane dynamics., Biochimica et Biophysica Acta, 1997, Vol.1357, No.2, pages 129 to 154	1-18
A	Antje Walther et al., A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR., Molecular Cell, 2000, Vol.5, No.5, pages 831 to 840	1-18
A	Mitsumori KAWAMINAMI et al., Gonadotropin-releasing hormone stimulates annexin 5 messenger ribonucleic acid expression in the anterior pituitary cells., Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, Vol. 291, pages 915 to 920	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 October, 2003 (27.10.03)Date of mailing of the international search report
11 November, 2003 (11.11.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10596

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	David Arboledas et al., Role of the N-terminus in the structure and stability of chicken annexin V., FEBS Letters, 1997, Vol.416, pages 217 to 220	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09, C07K14/47, C07K16/18, C07K7/08, A61K38/00, A61P5/24, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09, C07K14/47, C07K16/18, C07K7/08, A61K38/00, A61P5/24, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI(DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Volker Gerke et al., Annexins and membrane dynamics., Biochimica et Biophysica Acta, 1997, Vol.1357, No.2, p.129-154	1-18
A	Antje Walther et al., A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR., Molecular Cell, 2000, Vol.5, No.5, p.831-840	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 10. 03

国際調査報告の送達日

11.11.03

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JIP)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 坂崎 恵美子



4B 3227

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Mitsumori Kawaminami et al., Gonadotropin-releasing hormone stimulates annexin 5 messenger ribonucleic acid expression in the anterior pituitary cells., Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, Vol.291, p. 915-920	1-18
A	David Arboledas et al., Role of the N-terminus in the structure and stability of chicken annexin V., FEBS Letters, 1997, Vol.416, p. 217-220	1-18